

500,226

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/057895 A1

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 国際特許分類⁷: C12P 19/40</p> <p>(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13354</p> <p>(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 20 日 (20.12.2002)</p> <p>(25) 国際出願の言語: 日本語</p> <p>(26) 国際公開の言語: 日本語</p> <p>(30) 優先権データ:
特願 2001-399455
2001 年 12 月 28 日 (28.12.2001) JP
特願 2002-212348 2002 年 7 月 22 日 (22.07.2002) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ヤマサ
醤油株式会社 (YAMASA CORPORATION) [JP/JP]; 〒
288-0056 千葉県 銚子市 新生町 2 丁目 1 〇 番地の 1
Chiba (JP).</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 野口 利</p> | <p>忠 (NOGUCHI, Toshitada) [JP/JP]; 〒 288-0812 千
葉県 銚子市 栄町 2 丁目 1-12 Chiba (JP). 浜本 智
樹 (HAMAMOTO, Tomoki) [JP/JP]; 〒 288-0033 千
葉県 銚子市 南小川町 2935-2 Chiba (JP). 奥山
潔 (OKUYAMA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒 289-1345 千葉
県 山武郡 成東町 津辺 30-2 Chiba (JP). 渋谷 進
(SHIBUYA, Susumu) [JP/JP]; 〒 288-0814 千葉県 銚子
市 春日町 3091-3 Chiba (JP).</p> <p>(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE
PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT
OFFICE); 〒 103-0013 東京都 中央区 日本橋人形町 1
丁目 3 番 6 号 共同ビル Tokyo (JP).</p> <p>(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,</p> |
|---|---|

/続葉有/

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING 2'-DEOXYGUANOSINE

(54) 発明の名称: 2'-デオキシグアノシンの製造法

(57) Abstract: A process for producing 2'-deoxyguanosine, characterized by reacting at least one compound selected from the group consisting of guanosine, guanosine 5'-monophosphate, and 6-substituted 2-aminopurine with 2'-deoxynucleoside in the presence of nucleoside deoxyribosyl transferase and a hydrolase. By the process, 2'-deoxyguanosine can be efficiently synthesized from inexpensive and easily available starting materials. Since guanosine, which can be an obstacle to purification, is hardly present in the reaction mixture, isolation and purification are extremely easy. Thus, the process for producing 2'-deoxyguanosine is practical.

(57) 要約:

グアノシン、グアノシン 5' -モノリン酸及び 2 -アミノ - 6 -置換プリンの群から選ばれる 1 種の化合物と 2' -デオキシヌクレオシドをヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素の存在下で反応させることを特徴とする 2' -デオキシグアノシンの製造法。

本発明方法は、2' -デオキシグアノシンを安価で入手し易い原料を使用して効率的に合成することができ、精製の障害となるグアノシンが反応液にほとんど存在しないため単離精製も極めて容易で、実用的な 2' -デオキシグアノシンの製造法である。





TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

2' -デオキシグアノシンの製造法

技術分野

本発明は、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素の2種の酵素を併用（カップリング）した2' -デオキシグアノシンの製造法に関するものである。

背景技術

2' -デオキシヌクレオシド類は、アンチセンス医薬品（2' -デオキシヌクレオチドのオリゴマー等）を初めとする種々の医薬品の原料等に有用な化合物である。

従来、これらの2' -デオキシヌクレオシド類は、化学的に合成するか、白子等のDNAを酵素分解することにより調製されている。化学的合成法では製造コストが高く、またDNA分解法では生成する4種の2' -デオキシヌクレオシドの種別需要と供給のバランスが取れず、効率的ではないという問題がある。

近年、ヌクレオシド・ホスホリラーゼを用いた2' -デオキシヌクレオシド類の合成法が開発されている。この酵素法は、化学的に容易に合成可能な2' -デオキシウリジン又はチミジンを2-デオキシリボースの供与体とし、化学的に合成可能な核酸塩基又はリボヌクレオシドとリン酸イオンを添加することで、酵素の糖転移反応により目的とする2' -デオキシヌクレオシドを合成しようとするものである。

しかしながら、4種の2' -デオキシヌクレオシドの中で、グアニンの難溶性に起因して、2' -デオキシグアノシンだけがその効率的な製造法が確立されていないのが現状である（例えば、特開平11-137290号公報では、2' -

デオキシグアノシンの収率は、1 g/L (3.6 mmol/L) 程度である。)

従来この問題を解決するため、いくつかの方法が報告がなされている。

(1) 方法1；微生物を酵素源(ヌクレオシド・ホスホリラーゼ)として、2'-デオキシウリジン又はチミジンとグアノシン又はグアニル酸を基質として2'-デオキシグアノシンを合成する方法(特開平11-137290号公報)。

グアニンの代りにグアノシン又はグアニル酸を基質としても、2'-デオキシグアノシンの生成量はせいぜい6.3~7.3 g/L (22.8~26.4 mmol/L) 程度である。またこの方法では、大量の培養菌体を必要としたり、反応中のグアノシンと2'-デオキシグアノシンを分離精製しなければならないという問題点もある。しかし、グアノシンと2'-デオキシグアノシンはその物性がほぼ同一であることから、グアノシンと2'-デオキシグアノシンの混合物より2'-デオキシグアノシンのみを単離精製することはほとんど不可能であり、この方法は実用的な方法とはなり得ないと考えられる。

(2) 方法2；微生物を酵素源(ヌクレオシド・ホスホリラーゼ)として、2'-デオキシウリジン又はチミジンとジアミノプリンを基質としてジアミノプリン2'-デオキシリボシドを合成し、これにアデノシンデアミナーゼを作用させて2'-デオキシグアノシンを合成する方法(特開平11-137289号公報、米国特許第6197552号明細書)。

この方法は、溶解性の高いジアミノプリンを基質とすることで、上記方法1の欠点を改善するものであるが、ジアミノプリンは比較的高価な化合物であり、収率的にも必ずしも満足できる方法とはいえない。

(3) 方法3；チミジンを2'-デオキシリボース供与体としてグアニンとのヌクレオシドホスホリラーゼ反応による2'-デオキシグアノシンを合成する系において、生成するチミンを酵素分解して反応平衡を2'-デオキシグアノシン合成に傾けるという方法(特開平11-46790号公報、米国特許第6017736号明細書)。

この方法により 12～15 mmol/L 程度の 2'-デオキシグアノシンを合成できることが報告されているが、ウラシルチミンデヒドロゲナーゼ等の特殊な酵素を必要とし、必ずしも汎用性の高い方法とはいえない。

(4) 方法 4 ; 2'-デオキシリボース 1-リン酸とグアニンを基質とし、ヌクレオシドホスホリラーゼを触媒とした 2'-デオキシグアノシンの合成系に塩化カルシウム添加して合成効率を高める方法 (特開 2001-26599 号公報、国際公開第 00/70074 号パンフレット)。

しかしこの方法は、2'-デオキシリボース 1-リンの入手が困難であり、収率も 8 mmol/L 程度であり、実用に耐え得る方法ではない。

(5) 方法 5 ; 2'-デオキシリボース 1-リン酸とグリオキサールグアニンを基質とし、ヌクレオシドホスホリラーゼを触媒としたグリオキサールデオキシグアノシンを生成し、これをアルカリ分解して 2'-デオキシグアノシンを合成する方法 (特開 2001-269192 号明細書、欧州特許第 1138775 号明細書)。

この方法は 2'-デオキシリボース 1-リンの入手が困難であり、また、どの程度の収率で 2'-デオキシグアノシンが得られるかは明確に開示されていない。

更に本発明者らは、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを触媒とし、グアニンとチミジン又は 2'-デオキシウリジンを基質とした 2'-デオキシグアノシンの合成を先に提案したが、グアニンが難溶性のため、2～3 mmol/L 前後の 2'-デオキシグアノシンしか合成することができなかった (特開 2001-46097 号公報)。

このように、2'-デオキシグアノシンの酵素合成に関しては、種々検討されているが、実用的な方法は未だ提案されていない。

従って、本発明の目的は、安価で入手し易い原料を使用して酵素合成法による 2'-デオキシグアノシンの効率的かつ実用的な製造法を提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いた2'-デオキシグアノシンの製造法の検討を鋭意重ねた結果、安価なグアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸と、2'-デオキシグアノシン以外の2'-デオキシヌクレオシドを基質とし、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素であるヌクレオシダーゼを併用すると2'-デオキシグアノシンが効率的に製造できることを見出した。

一般に、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼは、溶解状態のグアニンしか基質として認識しないと考えられる。グアニンとチミジン又は2'-デオキシウリジンを基質とし、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いて2'-デオキシグアノシンの合成をした場合、2~3 mmol/L前後の2'-デオキシグアノシンしか合成できないため、グアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸（GMP）をヌクレオシダーゼでグアニンとリボース又はリボース5-リン酸に分解したとしても、グアニンはすぐに不溶状態となって析出し、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの基質とはなり得ないと考えられていた。

しかしながら、まったく驚くべきことに、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとヌクレオシダーゼとを併用（カップリング）した2'-デオキシグアノシンの製造法には、（1）ヌクレオシダーゼは、不溶状態のグアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸が存在したとしても、何の問題もなくグアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸を分解し続けること、（2）グアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸をヌクレオシダーゼでグアニンとリボースあるいはリボース5-リン酸に分解する際にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを反応系に共存させておくことで、生成したグアニンが析出する前にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの基質として認識され、速やかに2'-デオキシグアノシンが生成し、グアニンの析出はほとんど観察され

ないこと、(3)ヌクレオシダーゼは、リボヌクレオシド又はリボヌクレオチドのみに作用し、2'-デオキシヌクレオシドには作用しないので、ヌクレオシダーゼにより目的とする2'-デオキシグアノシンが分解されることはないこと、

(4)2'-デオキシグアノシンの単離精製の障害となるグアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸はヌクレオシダーゼで完全に分解させることが可能であるため、2'-デオキシグアノシンの単離精製が容易なこと等の数々の利点を有し、2'-デオキシグアノシンを高収率で製造できる実用的な方法であることを確認し、本発明を完成した。

更に、本発明者らは、グアニンの代わりに2-アミノ-6-置換プリンと2'-デオキシヌクレオシドを用い、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素を併用しても、2'-デオキシグアノシンを効率良く製造できることを見出した。

従来、上述したように、ヌクレオシドホスホリラーゼとアデノシンデアミナーゼとの併用によるデオキシヌクレオシド化合物の合成は種々報告されている(例えば、特開平11-137289号公報、米国特許6197552号明細書、特許第3033918号公報等)が、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素を併用してデオキシヌクレオシド化合物を製造することに関する報告はない。

本発明者らは、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いた反応の方が、ヌクレオシド・ホスホリラーゼを用いた反応より反応効率が高いことを見出し、更に当該酵素と加水分解酵素とを併用することで2'-デオキシグアノシンを効率よく製造できることを確認し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、グアノシン、グアノシン5'-モノリン酸及び2-アミノ-6-置換プリンの群から選ばれる1種の化合物と2'-デオキシヌクレオシドをヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素の存在下で反応させることを特徴とする2'-デオキシグアノシンの製造法を提供する

ものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明において使用するヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとしては、2-デオキシリボシル基を転移できる活性を有するものであれば特に限定されず、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ II 等が挙げられる。

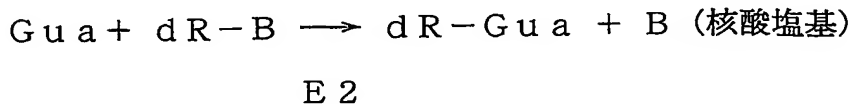
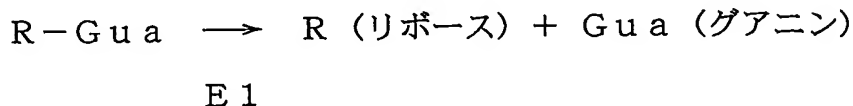
本発明において使用する加水分解酵素は、ヌクレオシダーゼ、2-アミノ-6-置換プリンの6位置換基を加水分解する酵素（以下、6位置換基加水分解酵素ということもある）である。

本発明の2'-デオキシグアノシンの製造法は、使用する加水分解酵素と化合物の種類により次の3種の製造法に分けられる。

使用する加水分解酵素がヌクレオシダーゼである場合は、次の2種の製造法が挙げられる。

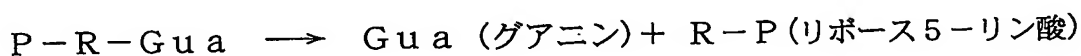
第一番目の製造法は、グアノシンと2'-デオキシヌクレオシドをヌクレオシダーゼとヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの存在下に反応させて行う2'-デオキシグアノシンの製造法である。

すなわち、グアノシン (R-Gua) をヌクレオシダーゼ (E1) で加水分解しグアニンを生成させ、次いで、もしくは同時並行的にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ (E2) の存在下でグアニンと2'-デオキシヌクレオシド (dR-B) とを反応させて2'-デオキシグアノシン (dR-Gua) を製造する。

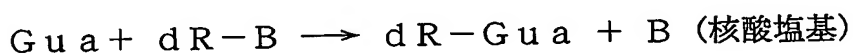


第二番目の製造法は、グアノシン 5' -モノリン酸と 2' -デオキシヌクレオシドをヌクレオシダーゼとヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの存在下に反応させて行う 2' -デオキシグアノシンの製造法である。

すなわち、グアノシン 5' -モノリン酸 (P-R-Gua) をヌクレオシダーゼ (E 1) で加水分解しグアニンを生成させ、次いで、もしくは同時並行的にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ (E 2) の存在下でグアニンと 2' -デオキシヌクレオシド (dR-B) とを反応させて 2' -デオキシグアノシン (dR-Gua) を製造する。



E 1



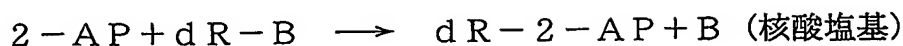
E 2

そして、これらのヌクレオシダーゼとしては、ヌクレオシド又はヌクレオチドを核酸塩基と糖又は糖リン酸に加水分解できる活性を有する酵素であればよく、プリンヌクレオシダーゼ、イノシン酸ヌクレオシダーゼ等が挙げられる。

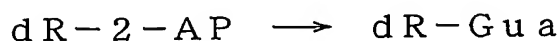
第三番目の製造法は、加水分解酵素が 2-アミノ-6-置換プリンの 6 位の置換基を加水分解する酵素である場合である。この 6 位置換基加水分解酵素には、2-アミノ-6-置換プリンを有するヌクレオシドの 6 位の置換基を加水分解する酵素も含まれる。この製造法は、2-アミノ-6-置換プリンと 2' -デオキシヌクレオシドとをヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと 6 位置換基加水分解酵素との存在下に反応させて行う 2' -デオキシグアノシンの製造法である。

すなわち、2-アミノ-6-置換プリン (2-AP) と 2' -デオキシヌクレオシド (dR-B) とをヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ (E 2) の存在下反応させて 2-アミノ-6-置換プリン-2' -デオキシリボシド (dR-2-AP) を生成させ、次いで 6 位置換基加水分解酵素 (E 3) で

当該生成物の 6 位置換基を加水分解して 2' -デオキシグアノシン (dR-Gua) を製造する。



E 2



E 3

この 6 位置換基加水分解酵素としては、2-アミノ-6-置換プリン又はそれを有するヌクレオシドの 6 位の置換基を加水分解して 2-アミノ-6-オキソプリン (グアニン) 又はそれを有するヌクレオシドを生成できる活性を有するものであれば特に限定されず、具体的にはデアミナーゼ、より具体的にはアデノシンデアミナーゼ等が挙げられる。

併用する酵素の組み合わせとしては、第一番目の製造法には、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I とプリンヌクレオシドに作用するヌクレオシダーゼ (プリンヌクレオシダーゼ) の組み合わせが、第二番目の製造法には、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I とイノシン酸ヌクレオシダーゼの組み合わせが、第三番目の製造法には、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I とアデノシンデアミナーゼの組み合わせがそれぞれ好適である。

本発明で使用する酵素は、いずれも公知の酵素であり、動物由来、植物由来、微生物に由来する特定酵素に限定されず、すべての由来の酵素を使用することができる。酵素調製の簡便性等の点から微生物由来の酵素を使用するのが好都合である。例えば、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼは乳酸菌に属する微生物から容易に調製でき、ヌクレオシダーゼ及びアデノシン・デアミナーゼは細菌、酵母、かびに属する微生物から容易に調製することができる

(Methods in Enzymology, Vol. LI, 446 (1978)、J. Am. Chem. Soc., 79, 630-633 (1957)、J. Biol. Chem., 276, 884-894 (2001)、Bull. Agric. Chem. Soc.

Japan, 23, 281-288(1959)、J. Biol. Chem., 242, 740-746 (1967)等参照)。

微生物を培養するための培地としては、これらの微生物が資化可能な炭素源及び窒素源を適当量含有し、必要に応じて金属塩、微量発育促進物質、消泡剤等を添加した培地が使用される。具体的には、培地成分としては糖類（グルコース、サッカロース等）、天然炭水化物（糖蜜、廃糖蜜、澱粉、麦、ふすま、米等）、アルコール類、脂肪酸類、炭化水素類等、窒素源としては、肉エキス、酵母エキス、大豆加水分解物等、金属塩としては亜鉛、鉄、マグネシウム等のリン酸塩、塩酸塩、硫酸塩等、微量発育促進物質としては、ビタミンB 1、ビタミンB 2、ビオチン等が挙げられる。

培養は、通常の液体培養法（振盪培養、通気攪拌培養、静置培養、連続培養等）又は固体培養法によって、20～50℃の温度条件下で必要により通気攪拌しながら、目的とする酵素活性が十分得られるまで行えばよい。

このようにして得られた培養物を、使用目的に応じ適宜処理加工したものを酵素調製物として使用する。酵素調製物は特に制限されるものではなく、例えば、微生物の培養物自体、培養物から通常分離手段（遠心分離、沈殿分離、凝集分離、洗浄、水抽出等）によって分離された菌体又はその菌体処理物又は酵素抽出物を挙げる事ができる。

菌体処理物としては、更に具体的には、生菌体を適当な緩衝液に懸濁し、超音波処理、フレンチプレス処理等により物理的に菌体を破碎するか、又はリゾチーム処理等酵素的に溶菌させた後、菌体残渣を遠心分離により除去した無細胞抽出液を挙げる事ができる。また、この無細胞抽出液又は前記の酵素抽出物を熱処理、硫酸塩析処理、透析処理、エタノール等の溶媒処理、各種クロマトグラフィー処理等の酵素精製に通常使用されている処理を単独で又は数種組み合わせて得られる粗精製酵素、精製酵素を例示することもできる。

更に、上記酵素の遺伝子がクローニングされている場合には、クローン化されたDNA断片を用い、公知の組換えDNA手法で目的とする酵素を調製すること

も可能である (Science, 277, (5331), 1453-1474, (1997)等参照)。すわな
ち、遺伝子のクローニング、クローン化したDNA断片を用いた発現ベクターの
調製、当該発現ベクターを用いた目的とする酵素活性を有する酵素の調製等は、
分子生物学の分野に属する技術者にとっては周知の技術であり、例えば
「Molecular Cloning」(Maniatis等編, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold
Spring Harbor, New York(1982))に記載の方法に従って行うことができる。

なお、乳酸菌のヌクレオシドデオキシリボシルトランスフェラーゼ遺伝子のク
ローニングと発現に関しては文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2234-
2245 (2000)) に記載されており、大腸菌のヌクレオシダーゼ遺伝子のクローニ
ングと発現に関しても文献 (J. Biol. Chem., 276, 884-894 (2001)) に記載さ
れており、また大腸菌のアデノシン・デアミナーゼ遺伝子のクローニングと発現
に関しても文献 (特開平5-219978号公報) に記載されている。

第一、二番目の製造法に使用するグアノシン及びグアノシン5'-モノリン酸
としては、市販のものが使用できる。

第三番目の製造法に使用する2-アミノ-6-置換プリンとしては、2-アミ
ノ-6-置換プリンにおける置換基が加水分解可能な基であるプリン誘導体であ
れば使用することができ、具体的には2-アミノ-6-ハロゲノプリン及び2,
6-ジアミノプリンを挙げることができる。なお、2-アミノ-6-ハロゲノプ
リンとしては、2-アミノ-6-クロロプリンが好ましい。

本発明で使用する2-デオキシリボースの供与体としての2'-デオキシヌク
レオシドとしては、市販の2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジ
ン、2'-デオキシウリジン、チミジン等を使用でき、2'-デオキシピリミジ
ンヌクレオシドが好ましく、特にチミジンが好適である。

2'-デオキシグアノシンの合成:

第一又は二番目の製造法による2'-デオキシグアノシンの合成は、10 mmol
/L以上、好ましくは20 mmol/L以上の濃度になるようにグアノシン又はグア

ノシン5'-モノリン酸と2'-デオキシヌクレオシドを水又は緩衝液(pH 3~10)に溶解又は懸濁させ、0.001ユニット/mL以上、好ましくは0.01ユニット/mL以上のヌクレオシダーゼとヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを使用し、10℃以上、好ましくは30℃以上、70℃以下、好ましくは65℃以下の温度条件で、10分~50時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施するのが好ましい。

この反応は、ヌクレオシダーゼによりグアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸をグアニンとリボース又はリボース5-リン酸に分解する際に、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを反応系に共存させておくことが肝要である。生成したグアニンが析出する前にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの基質として認識され、速やかに2'-デオキシグアノシンが生成し、グアニンの析出はほとんどない。

2'-デオキシグアノシンの合成条件は、例えば、(1)ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの酵素活性をヌクレオシダーゼの酵素活性より高め、具体的には2倍以上、好ましくは5倍以上に設定、(2)2'-デオキシヌクレオシドの濃度をグアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸の濃度より高めに、好ましくは2倍以上の濃度に設定することにより、2'-デオキシグアノシンを高収率で合成することが可能である。この最適条件は、小規模試験にて決定することができる。

第三番目の製造法による2'-デオキシグアノシンの合成反応は、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼによる反応と、加水分解酵素による反応の2つの反応工程からなり、2つの反応を同時並行的に行ってもよく、順次行ってもよい。

すなわち、10mmol/L以上、好ましくは20mmol/L以上の2'-デオキシヌクレオシドと2-アミノ-6-置換プリンとを水又は緩衝液に溶解又は懸濁させ、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いて2-アミノ-

6-置換プリン-2'-デオキシリボシドを調製し、この中間体を単離し又は単離することなく、アデノシン・デアミナーゼ等の加水分解酵素を水性媒体中で作用させることで目的とする2'-デオキシグアノシンを製造することができる。

この反応は、0.001ユニット/mL以上、好ましくは0.01ユニット/mL以上のヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ、及び2ユニット/mL以上、好ましくは20ユニット/mL以上のアデノシン・デアミナーゼを使用し、pH3~10、好ましくは5~9、温度10~60℃、好ましくは20~50℃の条件下で10分~50時間程度、必要により攪拌しながら実施するのが好ましい。

上記反応において、2-アミノ-6-置換プリン-2'-デオキシリボシドを反応液から単離することなく加水分解酵素を作用させる場合には、一旦加熱処理やアルカリ処理等を施してヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを失活させた後、加水分解酵素を作用させるのが好ましい。

上記いずれの反応も、反応温度が10℃未満のときは反応速度が遅く、反応効率が悪い。一方、反応温度が70℃を越える場合には酵素が変性、失活する可能性があり、好ましくない。また、反応途中でpHが変動するので、酸又はアルカリを用いて上記pH範囲に補正すればよい。

2'-デオキシグアノシンの精製：

生成した2'-デオキシグアノシンは核酸関連物質の精製法として通常使用されている方法又はこれを応用した方法によって分離精製することができる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過法等各種のクロマトグラフィー、向流分配、向流抽出等二液相間の分配を利用する方法、濃縮、冷却、有機溶媒添加等溶解度の差を利用する方法等の2'-デオキシヌクレオシドの分離精製で使用されている一般的な分離精製法を単独で又は適宜組み合わせて行えばよい。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

なお、実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4DNAリガーゼによるDNA連結及び大腸菌の形質転換法は、全て「Molecular Cloning」(前述)に従って行った。また、各種制限酵素、T4DNAリガーゼ等は全て宝酒造(株)より入手した。

また、酵素活性の測定と単位の算出は以下の方法で行った。

<ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの活性の測定>

5 mmol/Lのチミジンとシトシンを含有する20 mmol/LのMOPS-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 6.0)に酵素標品を加えて40℃に保温し、反応終了後、1分間煮沸することにより酵素を失活させた。2'-デオキシシチジンの生成量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、40℃で1分間に1 μ moleの2'-デオキシシチジンを生成する活性を1単位(ユニット)とした。

<ヌクレオシダーゼの活性の測定>

5 mmol/Lのグアノシン又はグアノシン5'-モノリン酸を含む20 mmol/L MOPS-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 6.5)に酵素標品を加え、37℃で保温し、反応終了後等量の0.1 mol/L水酸化ナトリウムを加えて反応を停止させる。反応液中のグアニンの生成量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、37℃で1分間に1 μ moleのグアニンを生成する活性を1単位(ユニット)とした。

<アデノシン・デアミナーゼの活性の測定>

アデノシンを含む反応液5 mL(50 mmol/Lトリス塩酸(pH 8.2), 30 mmol/Lアデノシン)をあらかじめ37℃に加温しておき、無細胞抽出液を5 μ L添加して、37℃で5分間反応させた後、0.2 mL採取して、等量の0.1 mmol/L水酸化ナトリウムと混合させることにより酵素を失活させる。この溶液

を166倍希釈後、イノシンの生成量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、37℃で1分間に1 μ moleのイノシンを生成する活性を1単位（ユニット）とした。

<プリン・ヌクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジン・ヌクレオシドホスホリラーゼの活性の測定>

特開平4-4882号公報に記載の方法に従い、70℃又は50℃におけるイノシン及びウリジンの加リン酸分解活性を測定した。

実施例1

(1) ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I の調製

文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2243-2245 (2000)) の方法に従って、乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018 株のヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (ndtB) のクローニングし、発現プラスミド pTrc-T2F4 を作製した。

プラスミド pTrc-T2F4 を保持する大腸菌 JM109 を 2xTY 培地に接種した。37℃ 2時間培養後、終濃度 0.1 mmol/L になるように IPTG を添加して 5時間培養した 25℃ にて 16時間培養して ndtB 遺伝子を大量発現させた。遠心分離により回収した菌体を破碎用懸濁液 (10 mmol/L トリス塩酸 (pH 8.0)、1 mmol/L EDTA) に懸濁し、超音波破碎、遠心分離により無細胞抽出液 (比活性 36.18 ユニット/mg-タンパク質) を調製した。

これを、更に前述の文献の方法に従って、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィーの操作により部分精製し、酵素標品 (比活性 36.69 ユニット/mg-タンパク質) を調製した。

(2) 大腸菌ヌクレオシダーゼの調製

(2-1) 大腸菌ヌクレオシダーゼ yaaF 遺伝子のクローニング

大腸菌 JM105 株 (ATCC 47016) の染色体 DNA を斉藤と三浦の方

法 (Biochim. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)) で調製した。このDNAをテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを常法に従って合成し、PCR法により大腸菌ヌクレオシダーゼ (y a a F) 遺伝子 (J. Biol. Chem., 276, 884-894 (2001)) を増幅した。

プライマー (A) : 5'-CTGAATTCGAAAGAGCTGCGTGTTCGATATTC-3'

プライマー (B) : 5'-GACTGCAGAATTTGCATAGACCGTTTTTCAGAGTA-3'

PCRによるy a a F遺伝子の増幅は、反応液100 μ L中 (50 mmol/L 塩化カリウム、10 mmol/L トリス塩酸 (pH 8.3)、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、0.001% ゼラチン、テンプレートDNA 0.1 mg、プライマーDNA (A) (B) 各々0.2 mmol/L、AmpliTaq DNAポリメラーゼ 2.5 ユニット) をPerkin-Elmer Cetus Instrument社製 DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性 (94℃、1分)、アニーリング (57℃、1.5分)、ポリメライゼーション (72℃、3分) のステップを25回繰り返すことにより行った。

遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム (1:1) 混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加し、DNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAを文献 (Molecular Cloning、前述) の方法に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、1.2 kb相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素EcoRI及びPstIで切断し、同じく制限酵素EcoRI及びPstIで消化したプラスミドpTrc99A (Pharmacia Biotech. 社より入手) とT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109菌を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrc-y a a Fを単離した。

pTrc-y a a Fは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のEcoRI-PstI切断部位に大腸菌のy a a F構造遺伝子を含有するEcoRI-PstI DNA断片が挿入されたものである。

(2-2) 大腸菌ヌクレオシダーゼ (Y a a F) の調製

プラスミド p T r c - y a a F を保持する大腸菌 J M 1 0 9 菌を、 $100\mu\text{L}/\text{mg}$ のアンピシリンを含有する 2 x Y T 培地 100mL に植菌し、 37°C で振盪培養した。菌体数が 4×10^8 個/ mL に達した時点で、培養液に最終濃度 $0.2\text{mmol}/\text{L}$ になるように I P T G を添加し、更に 37°C で 8 時間振盪培養を続けた。

培養終了後、遠心分離 ($9,000 \times g$, 10 分) により菌体を回収し、 10mL の緩衝液 ($20\text{mmol}/\text{L}$ 酢酸ナトリウム ($\text{pH} 6.0$)、 $1\text{mmol}/\text{L}$ 塩化マグネシウム) に懸濁した。超音波処理により菌体を破碎し、更に遠心分離 ($20,000 \times g$, 10 分) により菌体残渣を除去した。得られた無細胞抽出液を $1\text{mmol}/\text{L}$ 塩化マグネシウムを含有する $20\text{mmol}/\text{L}$ 酢酸ナトリウム ($\text{pH} 6.0$) 1L 、2 回の透析を行い、透析チューブより回収した液を遠心分離 ($20,000 \times g$, 10 分) することで沈殿物を除去した。得られた上清画分を D E A E - トヨパール 650 S 樹脂カラム (50mL ; (株) 東ソー) に吸着させ、同緩衝液で未吸着試料を溶出した後、 $200\text{mmol}/\text{L}$ 塩化ナトリウムを含有する同緩衝液を用いて塩濃度の直線勾配をかけることにより吸着試料を溶出させた。

ヌクレオシダーゼ活性を有する画分を回収し、これを同緩衝液 1L で透析した後、M o n o Q カラム (1mL ; アマシャムーフアルマシア) に吸着させた。未吸着試料を同緩衝液で溶出させた後、続いて $200\text{mmol}/\text{L}$ 塩化ナトリウムを含有する同緩衝液を用いて吸着試料を溶出させた。ヌクレオシダーゼ活性を有する画分を回収した後、同緩衝液 1L で透析し、得られたヌクレオシダーゼ活性画分を酵素標品とした。なお、酵素標品におけるヌクレオシダーゼ活性は 5.2 ユニット/ mg タンパク質であった。

(3) チミジンを用いた 2' - デオキシグアノシンの合成

$70\text{mmol}/\text{L}$ チミジン、 $35\text{mmol}/\text{L}$ グアノシンを含む $20\text{mmol}/\text{L}$ 酢

酸緩衝液 (pH 6.0) にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I 0.30 ユニット/mL, ヌクレオシダーゼ 0.06 ユニット/mL となるように酵素標品を添加し、42℃で攪拌しながら32時間反応させた。その結果、31.0 mmol/L の2'-デオキシグアノシンの生成が確認され、グアノシンは検出されなかった。

実施例 2

(1) イノシン酸ヌクレオシダーゼの調製

文献 (Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 23, 281-288 (1959)) の方法に従って、アスペルギル・オリゼの麹からイノシン酸ヌクレオシダーゼを調製する。

(2) チミジンを用いた2'-デオキシグアノシンの合成

25 mmol/L チミジン、25 mmol/L グアノシン5'-モノリン酸を含む20 mM MOPS-NaOH 緩衝液 (pH 6.5) にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I 0.33 ユニット/mL、イノシン酸ヌクレオシダーゼ 0.15 ユニット/mL となるように酵素標品を加え37℃で攪拌しながら18時間程度反応させ2'-デオキシグアノシンを得る。

実施例 3

(1) ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I の調製

ペプトン20 g/L、酵母エキス10 g/L、塩化ナトリウム5 g/L、グルコース1 g/L、100 µg/mL のアンピシリンを含有する栄養培地100 mLに、特開2002-17393号公報に記載の方法に従い調製した組換えベクター pTrc-T2F4 を保持する大腸菌形質転換体 JM109 [pTrc-T2F4] を植菌し、37℃で振盪培養した。

4 × 10⁸ 個/mL に達した時点で、培養液に終濃度0.1 mmol/L となるようにIPTGを添加し、更に37℃で5時間振盪培養を続けた。培養終了後、遠心分離 (9,000 x g、10分間) により培養菌体を回収し、10 mL の蒸留水に懸濁した。菌体懸濁液を超音波粉碎機にて処理して、更に遠心分離

(12, 000 x g、10分間)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を無細胞抽出液とした。

(2) プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼの調製

ペプトン20g/L、酵母エキス10g/L、塩化ナトリウム5g/L、グルコース1g/L、100 µg/mLのアンプシリンを含有する栄養培地100 mLに、特開平9-117298号公報に記載の方法に従い調製した組換えベクター pTrc-B56を保持する大腸菌JM109「pTrc-B56」を植菌し、37℃で振盪培養した。

4 × 10⁸ 個/mLに達した時点で、培養液に終濃度1 mmol/LとなるようにIPTGを添加し、更に37℃で5時間振盪培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9, 000 x g、10分間)により培養菌体を回収し、20 mLの緩衝液(50 mmol/L、トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)、5 mmol/L EDTA、0.1% Triton X100含有)に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度1 mg/mLとなるようにリゾチームを加え、37℃で1時間保温することで形質転換体を溶菌させ、更に遠心分離(12, 000 x g、10分間)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を無細胞抽出液とした。

(3) ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼの調製

ペプトン20g/L、酵母エキス10g/L、塩化ナトリウム5g/L、グルコース1g/L、100 µg/mLのアンプシリンを含有する栄養培地100 mLに、特開平6-253854号公報に記載の方法に従い調製した組換えベクター pTrc-pynを保持する大腸菌JM109[pTrc-pyn]を植菌し、37℃で振盪培養した。

4 × 10⁸ 個/mLに達した時点で、培養液に終濃度0.1 mmol/LとなるようにIPTGを添加し、更に37℃で16時間振盪培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9, 000 x g、10分間)により培養菌体を回収し、20 mLの緩衝液(50 mmol/L トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)、5 mmol/L EDTA、

0.1% Triton X100含有)に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度1 mg/mlとなるようにリゾチームを加え、37℃で1時間保温することで形質転換体を溶菌させ、更に遠心分離(12,000 x g、10分間)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を無細胞抽出液とした。

(4) アデノシン・デアミナーゼの調製

ペプトン20 g/L、酵母エキス10 g/L、塩化ナトリウム5 g/L、グルコース1 g/L、100 µg/mLのアンピシリンを含有する栄養培地100 mLに、特開平5-219978号公報に記載の方法に従い調製した組換えベクターpDR-addを保持する大腸菌形質転換体JM105 [pDR-add]を植菌し、37℃で振盪培養した。

4 × 10⁸ 個/mLに達した時点で、培養液に終濃度0.1 mmol/LとなるようにIPTGを添加し、更に37℃で3時間振盪培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9,000 x g、10分間)により培養菌体を回収し、10 mLの緩衝液(20 mmol/L トリス塩酸(pH 8.2)、10% エチレングリコール)に懸濁した。菌体懸濁液を超音波破碎機にて処理して、更に遠心分離(2,000 x g、10分間)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を無細胞抽出液とした。

(5) 2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドの合成(酵素の違いによるモル収率の比較)

100 mmol/L チミジン(ヤマサ醤油)、50 mmol/L 2-アミノ-6-クロロプリン(シグマ)、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I 0.385 ユニット/mL、又はプリン・ヌクレオシドホスホリラーゼ I I 0.77 ユニット/mLとピリミジン・ヌクレオシドホスホリラーゼ 0.385 ユニット/mLを含む溶液5 mLを40℃又は50℃で攪拌しながら16時間反応させた。反応結果を表1に示す。

表1から明らかなように、ヌクレオシドホスホリラーゼを用いるより、ヌクレ

オシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いた方が、効率よく2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドを合成することができる。なお、モル収率は、2-アミノ-6-クロロプリンが2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドの合成に利用された百分率で示す。

表 1

酵素名	合成された2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシド	モル収率(%)
ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I	46.4 mmol/L	92.8
プリン・ヌクレオシドホスホリラーゼ I I 及びピリミジン・ヌクレオシドホスホリラーゼ	39.1 mmol/L	78.1

(6) 2'-デオキシグアノシンの合成

上記(5)のヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I を用いて得られた反応液 1 mL に 20% 水酸化ナトリウムを 10 μ L 加えたのち、0.1 mL の 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) を加えたのち、アデノシン・デアミナーゼ 50 ユニット/mL を添加して 40℃ で攪拌しながら 13 時間反応させた。

その結果、43.2 mmol/L の 2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドから 42.0 mmol/L の 2'-デオキシグアノシンが合成されていた (モル収率 97.2%)。

実施例 4

(1) 2,6-ジアミノプリン-2'-デオキシリボシドの合成

100 mmol/L チミジン (ヤマサ醤油)、50 mmol/L 2,6-ジアミノプリン (シグマ)、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I 0.385 ユニット/mL を含む溶液 5 mL を 40℃ で攪拌しながら 16 時間反応さ

せた。この結果、 48.2 mmol/L の2, 6-ジアミノプリン-2'-デオキシリボシドが合成された。

(2) 2'-デオキシグアノシンの合成

上記(1)で得られた反応液1 mLに20%水酸化ナトリウムを $10 \mu\text{L}$ 加えたのち、 0.1 mL の 1 mol/L トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)を加えたのち、アデノシン・デアミナーゼ 50 ユニット/mL を添加して 40°C で攪拌しながら13時間反応させた。

その結果、 43.9 mmol/L の2, 6-ジアミノプリン-2'-デオキシリボシドから 41.2 mmol/L の2'-デオキシグアノシンが合成されていた(モル収率93.8%)。

産業上の利用可能性

ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素を併用(カップリング)する本発明方法は、2'-デオキシグアノシンを安価で入手し易い原料を使用して効率的に合成することができ、精製の障害となるグアノシンが反応液にほとんど存在しないため単離精製も極めて容易で実用的な2'-デオキシグアノシンの製造法である。

請求の範囲

1. グアノシン、グアノシン5'－モノリン酸及び2－アミノ－6－置換プリンの群から選ばれる1種の化合物と2'－デオキシヌクレオシドをヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素の存在下で反応させることを特徴とする2'－デオキシグアノシンの製造法。

2. 化合物がグアノシン、加水分解酵素がヌクレオシダーゼである請求項1記載の製造法。

3. ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼがヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼII、ヌクレオシダーゼがプリンヌクレオシダーゼ及び2'－デオキシヌクレオシドが2'－デオキシピリミジンヌクレオシドである請求項2記載の製造法。

4. 2'－デオキシヌクレオシドがチミジンである請求項2又は3項記載の製造法。

5. 化合物がグアノシン5'－モノリン酸、加水分解酵素がヌクレオシダーゼである請求項1記載の製造法。

6. ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼがヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼII、ヌクレオシダーゼがイノシン酸ヌクレオシダーゼ及び2'－デオキシヌクレオシドが2'－デオキシピリミジンヌクレオシドである請求項5記載の製造法。

7. 2'－デオキシヌクレオシドがチミジンである請求項5又は6記載の製造法。

8. 化合物が2－アミノ－6－置換プリン、加水分解酵素がデアミナーゼである請求項1記載の製造法。

9. ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼがヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼII、デアミナーゼがアデノシンデアミナー

ぜ及び2'-デオキシヌクレオシドが2'-デオキシピリミジンヌクレオシドである請求項8記載の製造法。

10. 2-アミノ-6-置換プリンにおける置換基が、加水分解可能な基である請求項8又は9記載の製造法。

11. 2-アミノ-6-置換プリンが2-アミノ-6-ハロゲノプリンである請求項8又は9記載の製造法。

12. 2-アミノ-6-ハロゲノプリンが2-アミノ-6-クロロプリンである請求項11記載の製造法。

13. 2-アミノ-6-置換プリンが2, 6-ジアミノプリンである請求項8又は9記載の製造法。

14. 2'-デオキシヌクレオシドがチミジンである請求項8又は9記載の製造法。

SEQUENCE LISTING

<110> YAMASA CORPORATION

<120> Process for the preparation of 2'-deoxyguanosine

<130> A02-0094

<140>

<141>

<150> JP 2001-399455

<151> 2001-12-28

<150> JP 2002-212348

<151> 2002-07-22

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of yaaF gene

<400> 1

ctgaattcga aagagctgcg tgcgatatt c

31

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of yaaF gene

<400> 2

gactgcagaa ttgcataga ccgttttcag agta

34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12P19/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12P19/38-40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/CA/WPIDS (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2001-46097 A (Yamasa Corp.), 20 February, 2001 (20.02.01), (Family: none)	1,8-14 2-7
Y A	JP 11-137289 A (Ajinomoto Co., Inc.), 25 May, 1999 (25.05.99), (Family: none)	1,8-14 2-7
A	JP 11-137290 A (Ajinomoto Co., Inc.), 25 May, 1999 (25.05.99), (Family: none)	1-14
A	EP 391592 A1 (UNIV TEXAS A&M SYSTEM), 10 October, 1990 (10.10.90), & JP 3-35789 A & US 5075225 A	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 March, 2003 (11.03.03)Date of mailing of the international search report
25 March, 2003 (25.03.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13354

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91/04322 A1 (VASILOIU ROXANA), 04 April, 1991 (04.04.91), & JP 7-500481 A & EP 491739 A1	1-14
A	MULLER M. et al., Addition of deoxyribose to guanine and modified DNA based by Lactobacillus helveticus trans-N-deoxyribosylase. Chem.Res. Toxicol., 1996 Oct. to Nov., 9(7), p.1140-4	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P19/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P19/38-40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/CA/WPIDS (STN)
JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP 2001-46097 A (ヤマサ醤油株式会社) 2001. 02. 20 (ファミリーなし)	1, 8-14 2-7
Y A	JP 11-137289 A (味の素株式会社) 1999. 05. 25 (ファミリーなし)	1, 8-14 2-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 03. 03

国際調査報告の発送日

25 03. 03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

印

4 B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 11-137290 A(味の素株式会社) 1999. 05. 25 (ファミリーなし)	1-14
A	EP 391592 A1 (UNIV TEXAS A&M SYSTEM) 1990. 10. 10 &JP 3-35789 A &US 5075225 A	1-14
A	WO 91/04322 A1 (VASILOIU ROXANA) 1991. 04. 04 &JP 7-500481 A &EP 491739 A1	1-14
A	MULLER M et al., Addition of deoxyribose to guanine and modified DNA based by Lactobacillus helveticus trans-N-deoxyribosylase. Chem Res Toxicol, 1996 Oct-Nov, 9 (7), p. 1140-4	1-14

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.